

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年9月7日 (07.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/64756 A1

- (51) 国際特許分類: C08B 37/08, A61K 31/726  
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/08894  
(22) 国際出願日: 2000年12月15日 (15.12.2000)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願2000-57688 2000年3月2日 (02.03.2000) JP  
(71) 出願人および  
(72) 発明者: 高井光男 (TAKAI, Mitsuo) [JP/JP]; 〒064-0917  
北海道札幌市中央区南17条西17丁目4-3 Hokkaido (JP).  
(72) 発明者: および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 甲野裕之 (KONO,  
Hiroyuki) [JP/JP]; 〒007-0828 北海道札幌市東区東雁  
来8条1丁目9-24 Hokkaido (JP).  
(74) 代理人: 佐伯憲生 (SAEKI, Norio); 〒103-0027 東京都  
中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo (JP).  
(81) 指定国 (国内): CA, KR, NO, US.  
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,  
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).  
添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイドスノート」を参照。

(54) Title: SALMON-ORIGIN CHONDROITIN SULFATE

(54) 発明の名称: 鮭由來のコンドロイチン硫酸

(57) Abstract: A novel chondroitin sulfate which can be produced more economically in a large amount and is expected as being useful for various purposes and processes for producing the same. Namely, a novel chondroitin sulfate which has an intermediate structure between the conventionally known whale-origin chondroitin sulfate and shark-origin chondroitin sulfate and is expected as useful for various purposes in the fields of drugs, cosmetics, food additives, etc. A process for producing the above-described chondroitin sulfate comprises grinding salmon nasal cartilage at a low temperature, defatting the ground matter, then treating it with an alkali and pronase, centrifuging the thus obtained liquid digested matter and then precipitating it from ethanol; and another process wherein the precipitate thus obtained is further treated with a cation exchange resin.

(57) 要約:

本発明は、より安価に、且つ大量に製造でき、尚かつ種々の有用な用途が期待できる新規なコンドロイチン硫酸と、その製造方法を提供することを目的とする。

本発明は、従来から知られている鯨由來のコンドロイチン硫酸と鮫由來のコンドロイチン硫酸との中間的な構造を取り、医薬品、化粧品、食品添加物等の分野において種々の用途が期待できる新規なコンドロイチン硫酸に関する。

また、本発明は、鮭の鼻軟骨を低温粉碎し、脱脂した後、アルカリ及びプロナーゼで処理し、得られた消化液を遠心分離後エタノール沈殿させることを特徴とする該コンドロイチン硫酸の製造方法、並びに、得られた沈殿を、更に、陽イオン交換樹脂で処理する該コンドロイチン硫酸の製造方法に関する。

WO 01/64756 A1

## 明細書

## 鮑由来のコンドロイチン硫酸

技術分野

本発明は、医薬品、化粧品、食品添加物等の分野において種々の用途が期待される新規なコンドロイチン硫酸に関する。

背景技術

コンドロイチン硫酸は、動物の結合組織に含まれる酸性ムコ多糖である。これは、D-グルクロン酸と、硫酸化されたN-アセチルガラクトサミンの二糖繰り返し構造から成り、構成糖の水酸基の硫酸化により多種多様な異性体が存在する。

硫酸化される部位はグルクロン酸の2位及び3位の水酸基、あるいはイズロン酸の2位の水酸基、及びN-アセチルガラクトサミンの4位及び6位の水酸基である。コンドロイチン硫酸鎖は、分子量 $10^4 - 10^5$ の直鎖状の多糖で、コア蛋白質に共有結合したプロテオグリカンとして存在する。一般に、天然に存在するコンドロイチン硫酸鎖は1種類の硫酸化二糖の繰り返しのみから成るものは少なく、通常、様々な種類の硫酸化、あるいは非硫酸化二糖を異なる割合で含む。

コンドロイチン硫酸は、酸性ムコ多糖のうちでは最も早く発見されたものである。1886年、FischerとBoedekerによって軟骨から分離され、最初はchondroitin acidと命名された。その後、硫酸エステルを持つことがわかりchondroitin sulfateと呼ばれるようになった。さらに1951年、Meyerらによって、コンドロイチン硫酸には3種類有り（A, B, C）軟骨中にはAとCが存在することが明らかにされた。

コンドロイチン硫酸鎖を持つプロテオグリカンとしては、アグリカン、バーシカン、デコリンなどがあるが、これらの機能は不明なものも多い。しかし、アグリカンの軟骨組織機能を制御する活性や、バーシカンの抗細胞接着活性は、コンドロイチナーゼ処理により完全に消失するので、コンドロイチン硫酸鎖がそれらの活性を担っていると考えられる。さらに、網膜神経細胞に対する神経栄養因子

や、神経突起伸張因子としてコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが単離されたが、これらの活性もコンドロイチナーゼ処理により消失した。最近では、コンドロイチン硫酸由来の二糖がナチュラルキラー細胞の活性化を抑えるという報告もある。また、コンドロイチン硫酸、カラギーナン、硫酸化デキストランなどの硫酸化多糖がインフルエンザウイルスや単純ヘルペスウイルスなど多数のウイルスの細胞への感染を阻害することは、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の出現以前から知られていた。

このように、コンドロイチン硫酸には多様な生理活性や物性が認められることから、抗炎症剤などの医薬品をはじめ、保湿剤として化粧品あるいは目薬に、また、ゲル化剤・ゼリー化剤等の食品添加物として利用されており、日常生活において意外に広い範囲で見かけることができる。また、これら通常の用途以外にも、その特性から様々な目的の医薬品などとして潜在的な利用価値が期待されている。

現在医療等に用いられているコンドロイチン硫酸は、鯨軟骨から抽出したコンドロイチン硫酸A（ChS-A、コンドロイチン4硫酸）及び鮫の鰭から抽出したコンドロイチン硫酸C（ChS-C、コンドロイチン6硫酸）である。最近では、捕鯨禁止によってChS-AからChS-Cに比重が移りつつあるが、鮫の鰭も中華料理の食材として価格が上昇している。そのため、より安価に、且つ大量にコンドロイチン硫酸を取得できる原材料及び方法が求められている。

従って、本発明の目的は、より安価に、且つ大量に取得でき、尚かつ種々の有用な用途が期待できる新規なコンドロイチン硫酸と、その取得方法を提供することにある。

### 発明の開示

本発明は、非硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位（以下、非硫酸化GalNAcと略す。）：（11.0±3.3）%，C6位一硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位（以下、C6位一硫酸化GalNAcと略す。）：（52.8±15.8）%，C4位一硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位（以下、C4位一硫酸化GalNAcと略す。）：（28.4±8.5）%，及びC4、C6位二硫酸化N-アセチル-D

—ガラクトサミンを含む二糖単位（以下、C4, C6位二硫酸化GalNAcと略す。）：（7.8±2.3）%を含んで成るコンドロイチン硫酸、及び、鮭の鼻軟骨を低温粉碎し、脱脂した後、アルカリ及びプロナーゼで処理し、得られた消化液を遠心分離後エタノール沈殿させることを特徴とする該コンドロイチン硫酸の取得方法、並びに、得られた沈殿を、更に、陽イオン交換樹脂で処理して該コンドロイチン硫酸を製造する方法、に関する。また本発明は、該コンドロイチン硫酸を含んでなる抗炎症剤及び保湿剤に関する。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のコンドロイチン硫酸は、例えば鮭の鼻軟骨から大量に得られる。

当該方法の概略は以下の通りである。

即ち、先ず、鮭の加工工程中に排出される頭部から表皮、硬骨、肉粒などを除き、鼻軟骨のみを分離して-120℃で粉碎したものを原料とする。低温粉碎することで、粉碎熱の発生による物質の変性及び酸化を防ぐことができる。また、常温粉碎では不可能なサイズへの微粉碎が可能となり、粒度も揃えられる。この軟骨粉から酸性ムコ多糖を抽出し、これをプロトン交換樹脂で処理してコンドロイチン硫酸画分を得る。操作方法等は、鯨及び鮫軟骨からのコンドロイチン硫酸抽出法のそれを参考にすることができる。

軟骨粉から精製コンドロイチン硫酸を製造するまでを更に詳しく記すと大略以下のようになる。

即ち、先ず、軟骨粉をアセトン等の有機溶剤により脱脂し、次いで、これを例えば苛性ソーダ水溶液等のアルカリ水溶液で処理し、中和した後、例えばアクチナーゼE等のプロナーゼで消化する。次に、この消化液を遠心分離し、酢酸等でpHを酸性にした後、エタノールを加えて沈殿を生じさせる。生じた沈殿を遠心分離操作で分取し、エタノールで洗浄した後、これを減圧乾燥する。

得られた酸性ムコ多糖を少量の脱イオン水に溶解し、これを、例えばDOWEX 50WX2等の陽イオン交換樹脂で処理した後、流出液を中和し、これを脱イオン水中で透析する。得られた溶液を濃縮し、メンブランフィルター等で濾過した後凍結乾燥すれば、コンドロイチン硫酸の精製品が得られる。

本発明のコンドロイテン硫酸を構成している二糖の存在比は、通常、

非硫酸化GalNAc(%) : 11.0 ± 3.3

C6位一硫酸化GalNAc(%) : 52.8 ± 15.8

C4位一硫酸化GalNAc(%) : 28.4 ± 8.5

C4, C6位二硫酸化GalNAc(%) : 7.8 ± 2.3

であるが、好ましくは、

非硫酸化GalNAc(%) : 11.0 ± 2.2

C6位一硫酸化GalNAc(%) : 52.8 ± 10.6

C4位一硫酸化GalNAc(%) : 28.4 ± 5.7

C4, C6位二硫酸化GalNAc(%) : 7.8 ± 1.6

である。

コンドロイチン硫酸を構成している二糖の存在比がこのような割合のものはこれまでに知られていない。

因みに、従来から知られている鯨軟骨由来のコンドロイチン硫酸では、C4位一硫酸化GalNAcが約70%と多い反面、C4, C6位二硫酸化GalNAcは1%以下と少なく、同じく従来から知られている鮫軟骨由来のコンドロイチン硫酸ではC6位一硫酸化GalNAcが約70%と多いが、C4位一硫酸化GalNAcは10数%と少ない。

また、本発明のコンドロイチン硫酸は硫酸基分布が従来のものよりもランダムな構造となっている。即ち、非硫酸化GalNAcを含む二糖単位、C6位一硫酸化GalNAcを含む二糖単位、C4位一硫酸化GalNAcを含む二糖単位、及びC4, C6位二硫酸化GalNAcを含む二糖単位がランダムに並んだ構造を有する。

本発明のコンドロイチン硫酸は、従来のものと同様、抗炎症剤などの医薬品をはじめ、保湿剤として化粧品あるいは目薬に、また、ゲル化剤・ゼリー化剤等の食品添加物として利用しうる。

更に、今後の展開として、コンドロイチン硫酸は生理的粘性が高いため配合薬剤とのブレンドによりその薬剤の局所滞留時間を延長させる効果が考えられる。また角膜コラーゲン繊維の安定化を促進し、目の組織の機能保持に有効であるこ

とが報告されていることから、鮭皮・牛皮などから抽出されるコラーゲンとのブレンドによって高機能性代用皮膚としての応用も考えられる。さらに生理・薬理活性だけではなく、高分子電解質としての特性を示すことから工業的応用も可能である。本発明のコンドロイチン硫酸は、鯨由来のコンドロイチン硫酸と鮫由来のコンドロイチン硫酸との中間的な構造を取るため、比較的広い範囲に応用できる可能性が期待できる。

### 実施例

以下に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

#### 実施例 1

##### (1) 軟骨の脱脂

鮭の加工工程中に排出される頭部から表皮、硬骨、肉粒などを除き、鼻軟骨のみを分離して、液体窒素下-120℃で粉碎したものを原料とした。

- 1) 約100mgの軟骨粉を2000mlの三角フラスコに入れ、アセトン700mlを加え、10分間攪拌した。
- 2) 5分間放置し上澄み液を除去した。
- 3) 1)-2)の操作をさらに3回繰り返した。
- 4) 残った沈殿を減圧デシケーターで乾燥した。
- 5) 得られた試料は-30℃で保存した。

##### (2) アルカリ処理

- 1) 脱脂済軟骨粉5gを0.2M NaOH 80mlに溶解した。
- 2) 37℃の湯浴中で、3時間攪拌した。
- 3) 酢酸でpH 7.0に中和した。

##### (3) プロナーゼ消化

- 1) 0.2M Tris-HCl緩衝液(pH 7.8) 10mlを加えた。

- 2) 酢酸カルシウムを終濃度0.02Mになるように加えた。
- 3) 防腐のためメタノール5mlを加えた。
- 4) アクチナーゼE50mgを加えた。
- 5) 37℃の湯浴中で、48時間ゆっくりと攪拌した。

#### (4) エタノール沈殿

- 1) 消化液を10,000rpm×30分間、4℃にて遠心分離した。
- 2) 上澄を0.45μmメンブランフィルターを用いて吸引濾過した。
- 3) 濾過液に5%相当の酢酸カルシウムを加えた。
- 4) 酢酸でpH4.5に調整した。
- 5) 2倍量のエタノールに加えて、48時間放置した。

#### (5) 沈殿の洗浄・乾燥

- 1) エタノール液を7,000rpm×30分間、4℃にて遠心分離した。
- 2) 沈殿を回収し80%エタノール300mlを加え、12時間ゆっくり攪拌した。
- 3) 10,000rpm×30分間、4℃にて遠心分離した。
- 4) 2) - 3) の操作を繰り返した。
- 5) 沈殿に100%エタノール200mlを加え、6時間ゆっくり攪拌した。
- 6) 10,000rpm×30分間、4℃にて遠心分離した。
- 7) 得られた沈殿（酸性ムコ多糖）を減圧デシケーターで乾燥した。（脱脂清軟骨粉からの見掛け歩留：44.0%）

#### (6) コンドロイチン硫酸の精製

##### (6-1) 前処理

- 1) DOWEX 50WX2陽イオン交換樹脂100mlを、3N HCl中で2時間攪拌し、水洗後、2N NaOH中で2時間攪拌した。
- 2) 上記の操作を3回繰り返した後、水洗した。

3) 2. 5 × 40 cm のカラムの下に脱脂綿を詰め、空気が入らないように樹脂を詰めた。

(6-2) DOWEX 50W×2陽イオン交換樹脂処理

1) 上記(5)で得られた得られた酸性ムコ多糖を、ごく少量の脱イオン水に溶解した。

2) カラムに1)を流し、20分間放置した。

3) カラムに400 ml (樹脂体積の約4倍) の脱イオン水を流した。

4) 流出液をすぐに1N NaOHで中和した。

(6-3) 精製

1) 中和液を脱イオン水中で3日間透析した。

2) エバボレーターにて20 ml 程に濃縮した。

3) 0.22 mメンブランフィルターにより濾過後、凍結乾燥し乾燥標品とした。(脱脂済軟骨粉からの見掛け歩留: 24.0%)

### 分析結果

上で得られた本発明のコンドロイチン硫酸(以下、ChS-Sと略記する。)に関する分析結果及び考察を以下に示す。なお、これらの組成分析、構造解析等に当たっては、アミノ糖、ウロン酸の定量はMorgan-Elson法、Bitter-Muir法を用いた。また硫酸基の置換度はRhodizonate法、元素分析によって行った。ChS-Sの分子量、純度検定はGPC、FT-IR、セルロースアセテート膜電気泳動を適宜使用した。構造解析は<sup>13</sup>C-NMR (100 MHz) 及び<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) を使用した。また硫酸置換位置の決定、その分布はChS-SのコンドロイチナーゼABC、コンドロイチナーゼACⅡによる二段階脱離酵素分解によって得られる不飽和二糖のHPLC、二次元NMR (COSY, <sup>1</sup>H-NMR水素核シフト相関など) 分析により行った。対照サンプルとしては市販のコンドロイチン4-硫酸(ChS-A、鯨軟骨由来) 及びコンドロイチン6-硫酸(ChS-C、鮫軟骨由来)(何れも生化学工業(株)製)を使用した。

## (1) ウロン酸の定量

各試料溶液に含まれるウロン酸の割合及びこの値から求めたコンドロイチン硫酸含量（純度）を表1に、また、陽イオン交換樹脂（DOWEX 50WX2）による処理（以下、プロトン交換処理と略す。）が純度及び収率に与える影響を表2にそれぞれ示した。なお、標準コンドロイチン硫酸のウロン酸含量は37%である。

これらの結果から、本法により非常に高純度のコンドロイチン硫酸を得られることがわかった。また、プロトン交換処理前後で純度が大幅に増加している。このことからプロトン交換処理によって、ヒアルロン酸やデルマタン硫酸などの他の酸性ムコ多糖は完全に除去できたものと考えられる。

表1 ウロン酸含量及び純度

	精製前 Ch S-S	Ch S-S	Ch S-A	Ch S-C
ウロン酸 (%)	25.50	36.49	35.63	36.88
純度 (%)	68.92	98.62	96.30	99.68

表2 各操作毎の本発明のコンドロイチン硫酸の収率

	見掛け歩留 (%)	純度 (%)	収率 (%)
脱脂軟骨	100	...	...
エタノール沈殿	44.0	68.9	30.3
プロトン交換処理	24.0	98.6	23.7

## (2) アミノ糖分析

各試料溶液のN-アセチルガラクトサミン（GalNAc）含量を表3に示した。また、プロトン交換処理前の酸性ムコ多糖からはN-アセチルグルコサミンが約0.3%検出されたが、Ch S-S、Ch S-A及びCh S-Cには全く確

認されなかった。その他のアミノ糖は何れにも含まれていなかった。このことから、コンドロイチン硫酸を構成するアミノ糖はN-アセチルガラクトサミンのみであること、プロトン交換処理によって他のアミノ糖を完全に除去できたことが確認できた。

表3 コンドロイチン硫酸のN-アセチルガラクトサミン含量

	精製前 Ch S-S	Ch S-S	Ch S-A	Ch S-C
GalNAc (%)	25.46	32.62	30.70	26.73

## (3) 元素分析

各サンプルに含まれる炭素、水素、窒素、酸素及び硫黄の重量比と硫酸化度をそれぞれ表4、表5に示した。表4からは、いずれのサンプルも同様の組成を示すことが確かめられた。表5からは、硫酸化度は鮫軟骨由来コンドロイチン硫酸が最も高く、本発明のコンドロイチン硫酸は他に比べるとやや低いという結果が得られた。

表4 コンドロイチン硫酸の組成分析結果

	C (%)	H (%)	N (%)	O (%)	S (%)
Ch S-S	39.86	5.48	3.25	45.91	5.50
Ch S-A	39.96	5.45	3.30	45.40	5.89
Ch S-C	40.97	5.62	3.15	43.98	6.28

表5 コンドロイチン硫酸1分子当たりの硫酸基含量

Ch S-S	Ch S-A	Ch S-C
0.72	0.77	0.80

## (4) 硫酸基定量

各サンプルに含まれる硫酸基及びここから算出した硫黄の比率を表6に示した。この結果から、硫酸基含量はChS-Sがやや多く、ChS-SとChS-Aは殆ど同じであることがわかった。また、これは上記(3)で述べた元素分析の結果とも一致した。

表6 各コンドロイチン硫酸の硫酸及び硫黄含量

	硫酸基 (%)	硫黄 (%)
ChS-S	18.62	6.15
ChS-A	18.52	6.15
ChS-C	21.74	7.17

## (5) 分子量測定

各サンプルの平均分子量と分子量分布を表7に示した。本発明のコンドロイチン硫酸の平均分子量は173,000であった。この値は他に比べるとやや大きいが、分子量分布はほぼ一致している。一般にコンドロイチン硫酸の分子量は、抽出方法により50,000-300,000の値をとることが知られている。今回得られたコンドロイチン硫酸の分子量分布も、これに一致するものであった。

表7 コンドロイチン硫酸の平均分子量及び分子量分布

	ChS-S	ChS-A	ChS-C
平均分子量	173,000	151,000	108,000
分子量分布	5-30×10 <sup>4</sup>	5-30×10 <sup>4</sup>	5-30×10 <sup>4</sup>

## (6) HPLC

二種類のコンドロイチン分解酵素を併用して酵素分解したコンドロイチン硫酸をHPLCを用いて分画し、定量して得られた、各々のコンドロイチン硫酸を構

成している二糖の存在比を表8に示す。また、ここから求めたコンドロイチン硫酸の硫酸化度 (GalNAc1分子あたりの硫酸基の数) を表9に示した。

表8から、本発明のコンドロイチン硫酸は、鯨由来のコンドロイチン硫酸と鮫由来のコンドロイチン硫酸との中間的な構造を取ることが判った。それ故、本発明のコンドロイチン硫酸は、比較的広い範囲に応用できるのではないかと考えられる。

表8 コンドロイチン硫酸の構成不飽和二糖

	Δ Di-0 S	Δ Di-6 S	Δ Di-4 S	Δ Di-di4,6 S
ChS-S (%)	11.0	52.8	28.4	7.8
ChS-A (%)	3.6	25.3	70.2	0.6
ChS-C (%)	7.7	71.2	13.2	7.6

Δ Di-0 S : 非硫酸化GalNAc

Δ Di-6 S : C6位一硫酸化GalNAc

Δ Di-4 S : C4位一硫酸化GalNAc

Δ Di-di4,6 S : C4, C6位二硫酸化GalNAc

表9 各々のコンドロイチン硫酸の硫酸化度

	ChS-S	ChS-A	ChS-C
硫酸化度	0.968	0.973	1.002

#### 産業上の利用可能性

本発明のコンドロイチン硫酸は、従来から知られている鯨由来のコンドロイチン硫酸と鮫由来のコンドロイチン硫酸との中間的な構造を取るため、比較的広い範囲に応用できる可能性が高く、従来のものと同様、抗炎症剤などの医薬品をはじめ、保湿剤として化粧品あるいは目薬に、また、ゲル化剤・ゼリー化剤等の食品添加物として利用しうることはもとより、平均分子量が従来のものよりも大きい

いことから、従来のものよりも生理的粘性が高いと考えられ、配合薬剤とのブレンドによりその薬剤の局所滞留時間を延長させる効果が期待できる。また、コンドロイチン硫酸に関する最近の報告として、角膜コラーゲン繊維の安定化を促進し、目の組織の機能保持に有効である旨の報告もあることから、鮭皮・牛皮などから抽出されるコラーゲンとのブレンドによって高機能性代用皮膚としての応用も期待出来る。さらに生理・薬理活性だけではなく、高分子電解質としての特性を示すことから工業的応用も期待できる。

## 請求の範囲

1. 非硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位：(11.0±3.3)%、C6位一硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位：(52.8±15.8)%、C4位一硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位：(28.4±8.5)%、及びC4, C6位二硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位：(7.8±2.3)%を含んで成るコンドロイチン硫酸。
2. 非硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位、C6位一硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位、C4位一硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位、及びC4, C6位二硫酸化N-アセチル-D-ガラクトサミンを含む二糖単位がランダムに並んだ構造を有する請求の範囲第1項に記載のコンドロイチン硫酸。
3. 鮭の鼻軟骨から得られた請求の範囲第1項に記載のコンドロイチン硫酸。
4. 鮭の鼻軟骨を低温粉碎し、脱脂した後、アルカリ及びプロナーゼで処理し、得られた消化液を遠心分離後エタノール沈殿させることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のコンドロイチン硫酸の製造方法。
5. 更に、得られた沈殿を、陽イオン交換樹脂で処理する請求の範囲第4項に記載のコンドロイチン硫酸の製造方法。
6. 請求の範囲第1項に記載のコンドロイチン硫酸を含んでなる抗炎症剤。
7. 請求の範囲第1項に記載のコンドロイチン硫酸を含んでなる保湿剤。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/08894

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C08B37/08, A61K31/726

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C08B37/08, A61K31/726

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Tadaaki TAKEDA et al., Sake Hana Nankotsu Yurai Chondroitin Ryusan no Gulcose Chokan Kyushu ni oyobosu Eikyo, Nihon Eiyou Shokuryou Gakkaishi, 1998, Vol.51, No.4, pp.213-217	1-4 5-7
Y	JP, 43-82, B (Taiyo Gyogyo K.K.), 05 January, 1968 (05.01.68) (Family: none)	5
Y	US, 5888984, A (Dermal Research Laboratories, Inc.), 30 March, 1999 (30.03.99) (Family: none)	6
Y	JP, 9-291011, A (KOSE Corporation), 11 November, 1997 (11.11.97) (Family: none)	7

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- \* Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
29 January, 2001 (29.01.01)Date of mailing of the international search report  
13 February, 2001 (13.02.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1' C08B 37/08, A61K 31/726

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1' C08B 37/08, A61K 31/726

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）  
CA (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	武田 忠明 外2名著、サケ鼻軟骨由来コンドロイチン硫酸のグルコース腸管吸収に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会誌、1998、Vol. 51, No. 4, p. 213-217	1-4
Y	J P, 43-82, B (大洋漁業株式会社), 5.1月. 1968(05.01.68) (ファミリーなし)	5-7
Y	U S, 5888984, A (Dermal Research Laboratories, Inc.), 30.3月. 1999(30.03.99) (ファミリーなし)	6
Y	J P, 9-291011, A (株式会社コーワ), 11.11月. 1997(11.11.97) (ファミリーなし)	7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 01. 01

国際調査報告の発送日

1302.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

弘實 謙二

4P 7433

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3492